

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/543, 33/532, G01R 33/12, A61K 49/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/23227 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. August 1996 (01.08.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00339		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BY, CA, CN, FI, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Januar 1996 (29.01.96)		(30) Prioritätsdaten: 195 03 664.6 27. Januar 1995 (27.01.95) DE	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): SCHERRING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): WEITSCHIES, Werner [DE/DE]; Gneisenaustrasse 65, D-10961 Berlin (DE). KÖTTITZ, Roman [DE/DE]; Arnold-Zweig-Strasse 12, D-13189 Berlin (DE). TRAHMS, Lutz [DE/DE]; Reinhardtstrasse 5, D-12103 Berlin (DE). BUNTE, Thomas [DE/DE]; Hilbertstrasse 4, D-12307 Berlin (DE).	
Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>			

(54) Title: PROCESS AND COMPOUNDS FOR THE MAGNETORELAXOMETRIC DETECTION OF ANALYTES AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VERBINDUNGEN ZUR MAGNETORELAXOMETRISCHEN DETEKTION VON ANALYTIEN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

A process for the magnetorelaxometric quantitative detection of analytes in liquid and solid phases, compounds for magnetorelaxometric detection and use thereof in analysis and immunomagnetography.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur magnetorelaxometrischen quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, Verbindungen zur magnetorelaxometrischen Detektion und deren Verwendung in der Analytik und Immunomagnetographie.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonia	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren und Verbindungen zur magnetorelaxometrischen Detektion von Analyten und deren Verwendung

- Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand,
5 daß heißt Verfahren zur magnetorelaxometrischen qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, Verbindungen zur magnetorelaxometrischen Detektion und deren Verwendung in der Analytik und Immunomagnetographie.
- 10 Es ist bekannt, daß die Immunszintigraphie es ermöglicht, pathologische Strukturen *in vivo* mit Hilfe radioaktiv markierter strukturspezifischer Substanzen, die im folgenden auch als Marker bezeichnet werden, zu detektieren. Üblicherweise werden dazu mit γ -Strahlern markierte Antikörper, oder Antikörperfragmente eingesetzt. Daneben kommen auch weitere strukturspezifische Substanzen wie z.B. Peptide oder
15 Oligo- oder Polynukleinsäuren zum Einsatz, bzw. werden in der Forschung erprobt. Der Anteil der spezifisch gebundenen Radioaktivität ist bei allen diesen Verfahren im allgemeinen jedoch gering. Dementsprechend ist bei diesen Untersuchungen das Niveau der nicht spezifisch gebundenen und damit im Blut zirkulierenden oder sich in Organen wie Leber, Niere, ableitende Harnwege oder Blase akkumulierenden
20 Marker sehr hoch. Diese hohe Hintergrundstrahlung verhindert in vielen Fällen eine ausreichende Detektion der pathologischen Strukturen. Panchapakesan [Immunol. Cell. Biol., 70 (1992) 295 und Ziegler [New England Journal of Medicine, 324 (1991) 430] weisen deshalb auf Verbesserungsmöglichkeiten für die
25 Immunszintigraphie hin. Derartige Möglichkeiten werden auch in der EP 0 251 494 beschrieben. Die meisten der Verfahren zielen darauf ab, die Ausscheidung der nicht spezifisch gebundenen Radioaktivität zu beschleunigen.
- Des Weiteren wurde verschiedentlich die Verwendung von mit paramagnetischen oder superparamagnetischen Substanzen konjugierten Antikörpern oder
30 Antikörperfragmenten zur Lokalisation pathologischer Strukturen *in vivo* vorgeschlagen. Als Detektionsverfahren kommen bisher für derartige markierte Antikörper die Kernspintomographie oder die auf Suszeptibilitätsänderungen beruhende Magnetometrie (WO 93/05818 und WO 91/15243) in Betracht. Auch bei diesen Detektionsverfahren bleibt das Problem des variablen Signalanteils durch
35 nicht gebundene Anteile des Markers sowie durch natürliche Variationen der Suszeptibilität und Relaxivität des Gewebes vorhanden. Des Weiteren sind die Methoden häufig nicht ausreichend empfindlich, um nur geringe Mengen spezifisch gebundener Marker detektieren zu können.

Ein Verfahren, das nur die Detektion des Anteils gebundener Marker ermöglicht und dadurch von dem Ausmaß der nicht gebundenen Marker unbeeinflußt ist, ist dagegen nicht bekannt.

5

Es ist ferner bekannt, daß quantitative Immunoassays sowie andere Bindungsassays (z.B. Rezeptorbindungsassays) es ermöglichen, eine sehr große Anzahl von Substanzen, die auch von biologischer Relevanz sein können, in Proben unterschiedlicher Zusammensetzung zu bestimmen. In der Regel wird hierbei jedoch 10 nur ein Parameter pro Probe in einem Assay bestimmt. Eine aktuelle Übersicht der verschiedenen Verfahren gibt T. Chard [An Introduction to Radio-immunoassay and Related Techniques: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 4. ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990)]. Grundlage aller Bindungsassays ist die hohe Nachweisempfindlichkeit isotopen- oder anders 15 markierter Verbindungen mit der großen Spezifität von Ligand-Rezeptorreaktionen.

Die bekannten Assayverfahren haben jedoch folgende Nachteile:

- Die Verfahren für die simultane Bestimmung verschiedener Analyten innerhalb derselben Probe basieren auf der Bindung unterschiedlich radio-, fluoreszenz- oder enzymologisch markierter Sonden an die Analyten. Dabei wird in der Regel nach anschließender Separation und Wäsche die nicht gebundene bzw. gebundene Aktivität der Sonde für die quantitative Bestimmung des Analyten gemessen. Die Menge der einsetzbaren unterschiedlichen Sondenlabel ist dabei stark begrenzt. So treten zum Beispiel im Falle von unterschiedlichen Radioisotopen als Sondenmarkierung sogenannte Überlappungsphänomene auf, die zu einem rapiden Verlust der quantitativen Genauigkeit der individuellen Signale führen. Die Kombination 25 verschiedener Enzyme als Sondenlabel verursacht vergleichbare Probleme, wobei die Durchführbarkeit hier zusätzlich durch die erforderliche Suche nach Reaktionsbedingungen, die die simultane Bestimmung der Enzymreaktionen in einem System erlauben, erschwert wird.
- Die Sensitivität der Verfahren ist begrenzt zum Beispiel durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Matrix und Sonde, oder aber durch limitierte 30 Markierungsmöglichkeit der Sonde (geringe spezifische Aktivität).

-3-

- Die erfolgreiche Durchführung der Verfahren setzt häufig eine Aufarbeitung des gewonnenen Probenmaterials (z. B. Herstellung von Serum bzw. Plasma aus Vollblut, Extraktion von Proben mit organischen Lösungsmitteln, Anreicherung des Analyten mittels chromatographischer Verfahren u.s.w.)
5 voraus.
- Für die erfolgreiche Durchführung der Verfahren sind Separations- und Waschschrifte, die der Trennung von gebundenen und ungebundenen Rezeptoren bzw. Liganden dienen, zumeist unerlässlich.
10
- Für die Durchführung von Radioimmunoassays ist der Einsatz teurer und in der Handhabung aufwendiger strahlender Nuklide erforderlich.
15
- Die Lagerung der bisher verwendeten Marker bereitet in der Praxis oft Probleme, da sie entweder nicht stabil sind (Radioimmunoassays) und deshalb stets frisch erzeugt werden müssen oder aber empfindlich auf Umgebungseinflüsse reagieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, neuartige Verfahren und
20 Substanzen zu entwickeln, die die Nachteile des Stand der Technik überwinden und die insbesondere in der Lage sind, ohne Anwendung radioaktiver Substanzen, den Aufenthaltsort und das Ausmaß der gebundenen Marker ohne vorherige Abtrennung von ungebundenem Marker zu detektieren.
25 Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde gefunden, daß die qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und/oder Festphasen gelingt, wenn ferro- oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen als nachzuweisende magnetische Markierung in Immunoassays
30 oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden und die Relaxation ihrer Magnetisierung als Meßgröße bestimmt wird.

Nachfolgend werden zunächst Verfahren beschrieben, die die Nachteile der bekannten Verfahren zur Durchführung von Immunoassays oder sonstigen
35 Bindungsassays überwinden.

Die erfindungsgemäßen Verfahren beruhen auf der Verwendung kolloidaler ferromagnetischer oder ferrimagnetischer Substanzen, im folgenden auch als

magnetische Markierung bezeichnet, die mit nachzuweisenden Substanzen, - im folgenden auch als Analyte bezeichnet -, oder strukturspezifischen Substanzen kombiniert werden. Derartige erfundungsgemäße Kombinationen aus magnetischen Markierungen mit Analyten oder strukturspezifischen Substanzen, die in dieser 5 Patentschrift noch näher beschrieben werden, werden im folgenden auch als magnetische Marker bezeichnet. Durch die Verwendung des Begriffes kolloidale Substanzen oder kolloidale Teilchen wird sowohl der Größenbereich der Teilchen oder Substanzen auf den Größenbereich von Kolloiden, d.h. den Bereich von 1 nm bis ca. 1000 nm, als auch deren Verwendung als dispergierte Phase in einem 10 geeigneten Dispersionsmedium, das zumeist wässrig ist, beschrieben. Die kolloidalen Substanzen oder Teilchen können zum Zweck der verbesserten Lager- und Transportfähigkeit auch in getrockneter Form oder eingefroren vorliegen, während der Durchführung von Messungen liegen sie jedoch in in flüssiger Phase dispergiertem Zustand vor.

15 Des Weiteren beruhen die Verfahren auf speziellen Meßtechniken, die es erlauben, nach Aufmagnetisierung der magnetischen Markierung, bzw. der magnetischen Marker die Relaxation der Magnetisierung zu bestimmen. Derartige in dieser Patentschrift näher beschriebene erfundungsgemäße Meßverfahren werden im 20 folgenden auch als Magnetrelaxometrie oder Magnetorelaxometrie oder magnetrelaxometrische Detektion bezeichnet.

Eine wesentliche Grundlage der Erfindung ist es, daß die Magnetisierung frei beweglicher ferro- oder ferrimagnetischer kolloidaler Teilchen nach Abschalten 25 eines äußeren magnetisierenden Feldes innerhalb der Meßzeit durch zwei verschiedene Mechanismen relaxiert:

- (i) Drehung des gesamten kolloidalen Teilchens innerhalb der umgebenden Flüssigkeit, wobei die Zeitkonstante vom hydrodynamischen Durchmesser der Teilchen einschließlich der Hülle, der Viskosität der Trägerflüssigkeit und der Temperatur abhängt, was hauptsächlich Parameter der Umgebung der Teilchen reflektiert, dieser Mechanismus wird im folgenden auch als Brownsche Relaxation oder extrinsischer Superparamagnetismus bezeichnet 30 und
- (ii) Drehung des internen Magnetisierungsvektors innerhalb der kolloidalen Teilchen, wobei die Zeitkonstante sehr empfindlich von Material und Form (Anisotropiekonstante des verwendeten Teilchenmaterials), Volumen und der Temperatur der verwendeten Teilchen abhängt. Dies sind im wesentlichen 35

intrinsische Parameter der Partikel, dieser Mechanismus wird im folgenden auch als Néelsche Relaxation oder intrinsischer Superparamagnetismus bezeichnet.

- 5 Die erfindungsgemäße Aufgabe wird dadurch gelöst, daß in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays ferro- oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen als nachzuweisende magnetische Markierung eingesetzt werden, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen im ungebundenen Zustand schneller verläuft als die Néelsche Relaxation. Die Anwendung derartiger ferro- oder
10 ferrimagnetischer kolloidaler Teilchen ermöglicht dann, durch die Änderung des dominierenden Relaxationsmechanismus beziehungsweise durch die Vergrößerung des Teilchenvolumens, die durch die Bindung eintritt, die spezifische Bestimmung des Anteils gebundener magnetischer Marker neben gleichzeitig in der Meßprobe vorhandenen ungebundenen magnetischen Markern.
15 Durch die Verwendung von empfindlichen Meßverfahren können bei erfindungsgemäßem Vorgehen unter Verwendung von ferro- oder ferrimagnetischen kolloidalen Partikeln höchstempfindliche bindungsspezifische Immunoassays oder sonstige Bindungsassays aufgebaut werden, die sowohl in flüssiger Phase als auch an fester Phase durchgeführt werden können. Als besonders empfindliches
20 Meßverfahren kann nach Aufmagnetisierung der Probe in einem magnetisierenden Feld und nach Abschalten des Feldes die Relaxation der Magnetisierung mittels hochempfindlicher Magnetfelddetektoren (wie z.B. Superconducting Quantum Interference Devices (SQUIDs), Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-
25 Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler) oder die komplexe Suszeptibilität der Probe als Funktion der Frequenz des magnetisierenden Feldes bestimmt werden.
Bei den erfindungsgemäßen Verfahren zur magnetrelaxometrischen quantitativen
30 Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen werden desweiteren die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert.
Diese magnetisch markierten strukturspezifischen Substanzen werden der zu
vermessenden flüssigen oder immobilisierten Probe beigesetzt und die zu
35 vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert. Nach Abschalten des äußeren Feldes wird die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt hier, wie auch bei den nachfolgend beschriebenen direkten Assayverfahren, nach dem Fachmann bekannten Methoden.

- Das erfindungsgemäße Verfahren zur magnetrelaxometrischen quantitativen
- 5 Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, kann auch so durchgeführt werden, daß Analyte zunächst
- (i) mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden und anschließend
 - (ii) diese magnetisch markierten Analyte in einer zu vermessenden flüssigen oder
- 10 immobilisierten Probe eingesetzt werden, der Substanzen zugesetzt werden, die die Analyte spezifisch binden, und die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird.
- 15 Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt hier, wie auch bei den nachfolgend beschriebenen kompetitiven Assayverfahren, in dem Fachmann bekannter Weise, d.h. analog zu den Verfahren wie sie bei Immunoassays oder Radioassays angewandt werden.
- 20 In beiden vorgenannten Fällen kann zur Analyse auch die Messung der durch die Bindung veränderten komplexen Suszeptibilität der magnetischen Markierung bzw. des magnetischen Markers als Funktion der Frequenz herangezogen werden.
- 25 Die bisher nur in Ausnahmefällen mögliche Diskriminierung zwischen gebundenen und ungebundenen Markern wird durch die Ausnutzung ihrer unterschiedlichen Relaxationsmechanismen oder die durch die Bindung verursachte Beeinflussung der Relaxationszeit des magnetischen Markers ermöglicht.
- 30 Festphasengebundene Analyte können erfindungsgemäß insbesondere dadurch nachgewiesen werden, indem die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst
- (i) mit im Zeitbereich der Messung relaxierenden ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden, wobei die ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen so gewählt werden, daß die Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und anschließend

- (ii) diese magnetisch markierten Substanzen in einer zu vermessenden immobilisierten Probe eingesetzt werden, und die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei das unterschiedliche Relaxationsverhalten festphasengebundener und ungebundener magnetischer Marker zur Analyse herangezogen werden. Als Meßgröße kann auch die komplexe Suszeptibilität der Proben als Funktion der Frequenz bestimmt werden.

10

Auch in diesem Fall ist es möglich, anstelle strukturspezifischer Substanzen die nachzuweisenden Analyten mit den magnetischen Markierungen zu kombinieren.

15 In flüssiger Phase können Analyte erindungsgemäß insbesondere dadurch nachgewiesen werden, indem die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst

- 20 (i) mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden, wobei die ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen so gewählt werden, daß die Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und anschließend

25 (ii) diese magnetisch markierten Substanzen in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden, und die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei das unterschiedliche Relaxationsverhalten der mit dem Analyten gebundenen gegenüber den ungebundenen magnetischen Marker zur Analyse herangezogen wird.

30 Als Meßgröße kann auch die komplexe Suszeptibilität der Proben als Funktion der Frequenz bestimmt werden.

Auch in diesem Fall ist es möglich, anstelle strukturspezifischer Substanzen die nachzuweisenden Analyten mit den magnetischen Markierungen zu kombinieren.

35

Unter strukturspezifischen Substanzen sind alle Substanzen zu verstehen, die spezifisch an bestimmte Strukturen binden. Unter strukturspezifischen Substanzen sind insbesondere Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin bindende

Substanzen wie Avidin und Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten wie Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipoproteine etc. zu verstehen. Als strukturspezifische Substanzen sind Substanzen bevorzugt, deren Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ liegt. Insbesonders bevorzugt sind Substanzen deren Bindungskonstante im Bereich von 10^7 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ liegt.

- Die strukturspezifischen Substanzen oder nachzuweisenden Analyte lassen sich mit Hilfe in der Immuno-, Peptid- und Proteinchemie geläufiger Verfahren mit den ferri- oder ferromagnetischen Teilchen markieren. Besonders vorteilhaft sind kovalente Bindungen zwischen den strukturspezifischen Substanzen beziehungsweise den nachzuweisenden Analyten mit den die stabilisierende Hülle der ferri- oder ferromagnetischen Teilchen bildenden Substanzen. Beispiele für besonders geeignete Methoden sind die Aktivierung und Kopplung mittels Carbodiimiden [Jakoby and Wilchek, eds.: Methods Enzymol. (1974) 34], die Bildung von Schiff'schen Basen nach Einwirkung von Periodaten auf Kohlenhydrate enthaltende Verbindungen (Wichek and Bayer, eds., Methods Enzym 184:177), die gegebenenfalls zur weiteren Stabilisierung anschließend noch reduziert werden, die Kopplung mittels Glutardialdehyd [Heitzmann and Richards. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 3537], die Quervernetzung bromoacetylierter Teilchen mit thiolylierten Substanzen [Angerer et al.; Cell 9 (1976) 81], sowie die reduktive Alkylierung (Bayer et al.; J. Histochem. Cytochem. 24 (1976) 933].
- Es können auch ferromagnetische oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen, mit einer stabilisierenden Hülle aus der strukturspezifischen Substanz oder dem nachzuweisenden Analyten hergestellt werden, indem die Teilchen nach Herstellung direkt in eine Lösung der strukturspezifischen Substanz, gegebenenfalls in Gegenwart weiterer Hilfsstoffe wie z.B. Proteine, Kohlenhydrate sowie natürliche, synthetische oder partialsynthetische oberflächenaktive Substanzen usw. gebracht werden, bzw. direkt in Gegenwart der strukturspezifischen Substanzen hergestellt werden.
- Geeignete kolloidale Teilchen und diese Teilchen enthaltende Suspensionen werden beispielsweise in der WO 92/12735, der WO/92/22586, der EP 0 186 616 und der US 4,101,435 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann z.B. in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergologie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik und medizinischen Diagnostik zum Einsatz kommen.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen zur magnetrelaxometrischen Detektion, die aus kolloidalen Suspensionen frei beweglicher ferrimagnetischer oder ferromagnetischer Teilchen und strukturspezifischen Substanzen beziehungsweise nachzuweisender Analyte bestehen,

10

wobei unter strukturspezifischen Substanzen insbesondere Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin bindende Substanzen wie Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten wie Zytokine, Lymphokine, Endotheline oder deren Antagonisten, sonstige spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, 15 Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipoproteine etc. zu verstehen sind.

Die Verbindungen zur magnetrelaxometrischen Detektion können auch aus Kombinationen mehrerer ferromagnetischer oder ferrimagnetischer Teilchen mit diskriminierbaren Relaxationszeiten bestehen, da bei Verwendung von

20

unterschiedlichen magnetischen Markierungen mit jeweils sehr enger Verteilung der Relaxationszeiten und/oder magnetischen Momenten für verschiedene strukturspezifische Substanzen, bzw. Analyte innerhalb einer Probe individuell diskriminierbare Meßergebnisse erzielt werden können. Dadurch wird eine direkte simultane quantitative Bestimmung mehrerer Analyte ermöglicht.

25

Als Suspensionsmedien kommen alle Flüssigkeiten in Betracht, in denen die kolloidalen Teilchen frei beweglich sind. Besonders geeignet sind Wasser, wäßrige Lösungen oberflächenaktiver Hilfsstoffe, wie z.B. Tenside oder oligomere oder polymere Kohlenhydrate und Proteine, sowie Mischungen aus Wasser mit Alkoholen wie z.B. Glycerol und Polyethylenglykol. Die Suspensionsmedien können zusätzlich den osmotischen Druck verändernde Hilfsstoffe wie z.B. Kochsalz enthalten. Des Weiteren können den pH-Wert bestimmende Puffersubstanzen, wie z.B. Phosphate, enthalten sein.

35

Die Verbindungen aus den ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen Teilchen mit strukturspezifischen Substanzen oder nachzuweisenden Analyten können auch in getrockneter Form, gegebenenfalls in Kombination mit weiteren

-10-

Hilfsstoffen die z.B. die Trocknung erleichtern oder die Stabilität des getrockneten Produkts erhöhen, vorliegen (z. B. als Lyophilisate).

- Die Bestimmung des Analyten kann mit oder ohne Separations- und Waschschrifte
- 5 durchgeführt werden. Bei der Durchführung von Messungen mit Separationsschritten zwischen gebundenen und ungebundenen magnetischen Markern können erfindungsgemäß alle ferro- oder ferrimagnetischen kolloidalen Substanzen als magnetische Markierungen zur magnetrelaxometrischen Detektion eingesetzt werden. Besondere Anforderungen an die Brownschen Relaxationzeiten und die
- 10 Néelschen Relaxationszeiten sind in diesen Fällen nicht mehr erforderlich.
- Aufgrund des auf physikalischen Mechanismen beruhenden Bindungsnachweises können unspezifische Meßsignale (Matrixphänomene) weitgehend ausgeschlossen werden. Die Spezifität des Verfahrens hängt somit nur noch von der "wahren"
- 15 Spezifität der strukturspezifischen Substanz (Kreuzreakтивität von Antikörpern, unspezifische Bindung von Liganden) ab.
- Aufgrund der hohen Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die sonst üblichen Detektionsgrenzen von Bindungsassays mühelos unterschritten.
- 20 Als Substanzen für die magnetische Markierung können alle ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Materialien verwendet werden, die sich in einem zur magnetorelaxometrischen Detektion geeigneten Medium kolloidal dispergieren lassen. Bei Verwendung der Substanzen für magnetorelaxometrische Detektionen, die ohne Separationsschritte zwischen gebundenen und ungebundenen magnetischen
- 25 Markern durchgeführt werden, muß die Néelsche Relaxationszeit der magnetischen Markierungen unter den Meßbedingungen größer als die Brownsche Relaxationszeit der magnetischen Marker sein. Besonders geeignet sind alle ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen Teilchen mit Brownschen Relaxationszeiten in wäßrigen Medien im Bereich von 10^{-8} - 10^{-1} s und Néelschen Relaxationszeiten
- 30 größer als 10^{-8} s. Für die Durchführung von Messungen ohne Separationsschritte muß die Viskosität des verwendeten Dispergiermediums mit den Relaxationszeiten der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Teilchen und der Meßzeit abgestimmt werden, da das Suspensionsmedium wesentlich die Zeitkonstante der Brownschen Relaxation bestimmt.
- 35 Bevorzugt sind insbesondere ferromagnetische oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen aus Eisen, Eisenoxiden, Bariumferriten, Strontiumferriten, Kobalt, Nickel,

Nickelferriten, Kobalferriten und Chromdioxid deren Néelsche Relaxationszeit größer als die Brownsche Relaxationszeit ist.

- Die Verwendung von magnetischen Markierungen mit eng verteilten Partikelgrößen und/oder magnetischen Momenten ist im allgemeinen vorteilhaft. Eine Auftrennung magnetischer Markierungen in Fraktionen mit enger Verteilung der Partikelgrößen kann z.B. durch chromatographische Verfahren oder unter Verwendung spezieller Filtrationsverfahren (z.B. Glaskapillarsysteme oder Tangentialfiltration), durch die Verwendung von Molekularsieben oder mittels Zentrifugation erreicht werden.
- 10 Magnetische Markierungen mit möglichst einheitlichen Momenten lassen sich z.B. durch Klassierung in einem magnetischen Gradientenfeld herstellen.

Die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen können mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, Tensiden, sonstigen Monomeren, Oligomeren oder Polymeren und/ oder Lipiden stabilisiert sein.

- Die Teilchengrößen der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen liegen vorteilhafterweise zwischen 1 nm und 400 nm. Insbesonders bevorzugt sind 20 Teilchengrößen zwischen 1 nm und 100 nm.

Verfahrensgemäß erfolgt die magnetrelaxometrische Detektion mit Meßanordnungen, die zunächst eine Aufmagnetisierung der zu untersuchenden Probe mittels eines geeigneten Magnetfeldes erlauben und anschließend die Messung der magnetischen Relaxation der magnetischen Marker ermöglichen. Eine 25 Meßanordnung für die magnetrelaxometrische Detektion von Analyten, wie sie in den Beispielen verwendet wurde, ist in Figur 1 dargestellt. Im Gegensatz zu allen anderen bereits bekannten Verfahren (JP-235774 und WO 91/15243) wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Messung der Relaxation der Magnetisierung nicht 30 die statische Magnetisierung in Gegenwart des magnetisierenden Feldes gemessen, sondern deren zeitliche Veränderung in Abwesenheit des magnetisierenden Feldes. Erst dadurch werden Informationen über den Bindungszustand der Marker zugänglich. Des weiteren wird dadurch eine Beeinflussung des Meßsignals durch dia- oder paramagnetische Komponenten beziehungsweise Verunreinigungen vermieden. 35 Ferner wird die Meßempfindlichkeit entschieden gesteigert.

Es ist ferner möglich, die Messung der frequenzabhängigen Magnetisierung des Markers infolge eines geeigneten magnetischen Wechselfeldes (Bestimmung der

-12-

- komplexen Suszeptibilität als Funktion der Frequenz) mittels hochempfindlicher Sensoren, wie zum Beispiel SQUIDs, in Anwesenheit des Feldes durchzuführen. Hierbei wird die spezifische Frequenzabhängigkeit des Suszeptibilität des magnetischen Markers im Gegensatz zur separat bestimmbarer
- 5 Frequenzabhängigkeit der para- oder diamagnetischen Komponenten ausgenutzt. Auch dieses Vorgehen steht im Gegensatz zu dem in WO 91/15243 vorgeschlagenen Verfahren zur Bestimmung der Suszeptibilität superparamagnetischer Substanzen. In WO 91/15243 wird weder die Frequenzabhängigkeit der Suszeptibilität der magnetischen Marker beschrieben, noch ein Verfahren zur Nutzung dieser
- 10 Eigenschaft.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren, die es ermöglichen, den Aufenthaltsort und das Ausmaß der spezifisch gebundenen Marker ohne Beeinflussung durch im Blut zirkulierende Marker zu detektieren. Bei diesen

15 Verfahren wird die Anwendung radioaktiver Substanzen vermieden, wie sie zur Durchführung szintigraphischer Verfahren des Standes der Technik bisher unumgänglich sind.

Die erfundungsgemäßen Verfahren beruhen darauf, daß die

20 Relaxationzeitunterschiede zwischen gebundenen und ungebundenen magnetischen Markern in Flüssigkeiten, sowie die Veränderung des dominierenden Relaxationsmechanismus durch Bindung der magnetischen Marker an Festphasen auch zur magnetrelaxometrischen Detektion von Substanzen oder Strukturen *in vivo* eingesetzt werden können. Derartige Verfahren werden im folgenden auch als

25 Immunmagnetographie oder Immunomagnetographie bezeichnet.

Die *in vivo*-Messung der räumlichen Verteilung einem Menschen applizierter im Zeitbereich der Messung relaxierender magnetischer Marker kann durch zwei verschiedene Meßmethoden erfolgen:

- 30 1. Erzeugung eines möglichst homogenen Magnetfeldes im interessierenden Volumen, Abschalten des Feldes und Messung der räumlichen Verteilung des relaxierenden Magnetfeldes mittels eines Multikanalsensors. Dieser sollte das Meßobjekt möglichst vollständig umschließen. Zur Erzeugung ausreichender Meßinformation ist eine mehrfache Meßdurchführung unter sequentieller Abrasterung des Meßobjektes ebenfalls möglich.
- 35 2. Sequentielle Erzeugung eines räumlich begrenzten lokalen Feldes, Abschalten des Feldes und Messung der räumlichen Verteilung des relaxierenden

Magnetfeldes mittels eines Einkanalsensors. Die Verwendung eines Multikanalsensors ist ebenfalls möglich.

Bei beiden Methoden ist zur Gewinnung maximaler Information sowohl die
5 Magnetisierung des Meßobjektes als auch die Messung des resultierenden Magnetfeldes in allen drei Raumrichtungen zu bevorzugen.

Die Messung läßt sich durch ein Modell beschreiben, wie es auch bei der Analyse
der Magnetfelder von bioelektrischen Strömen Anwendung findet. Als Grundlage
10 wird dort das Modell des magnetischen Dipols, Multipols oder Multi-Dipols
angenommen. Die speziellen Parameter des Modells, insbesondere die Orte der
Dipole oder Multipole, werden durch ein geeignetes Approximationsverfahren
gefunden, das die Abweichungen zwischen Meßdaten und Modellparametern
minimiert. Diese Parameter geben Aufschluß über die räumliche Verteilung der
15 magnetisierten Teilchen.

Eine analoge Vorgehensweise ist bekannt und bewährt für die Analyse der
Magnetfelder von bioelektrischen Strömen.

20 Als für die Immunmagnetographie geeignete Verfahren und Verbindungen können
alle für die magnetrelaxometrische Detektion aufgeführten Verfahren und
Substanzen angewendet werden.

25 Besonders geeignet zur Durchführung der Immunmagnetographie sind magnetische
Markierungen, die biologisch abbaubar und verträglich sind. Dies trifft insbesondere
für magnetische Markierungen zu, die aus Eisenoxiden bestehen.

Zur Durchführung bindungsspezifischer magnetrelaxometrischer Detektionen *in vivo*
ist es erforderlich, daß die Brownschen Relaxationszeiten der in den menschlichen
30 Körper eingebrachten Kombinationen aus ferri- oder ferromagnetischen Substanzen
mit strukturspezifischen Substanzen bei Körpertemperatur in Körperflüssigkeiten
kürzer als die Néelschen Relaxationszeiten sind.

Unter strukturspezifischen Substanzen sind in der Immunmagnetographie
35 insbesondere alle Substanzen zu verstehen, die spezifisch an nachzuweisende
Strukturen des menschlichen Körpers binden. Besonders geeignet sind Antikörper,
Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren
Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme,

-14-

Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine. Von den an Rezeptoren bindenden Agonisten sind insbesondere Zytokine, Lymphokine oder Endotheline geeignet.

- 5 Gut geeignet sind alle strukturspezifischen Substanzen, die eine Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ aufweisen. Insbesonders geeignet sind alle strukturspezifischen Substanzen, die eine Bindungskonstante im Bereich von 10^7 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ aufweisen.
- 10 Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

-15-

Beispiel 1

100 µg eines monoklonalen Antikörpers gegen Collagen III, im folgenden Anti-Collagen III genannt, werden in 500 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung
5 gelöst. 1 ml dextrangecoatete Magnetitsuspension (Meito Sangyo) mit 1 Mol Fe/I und einer Teilchengröße von ca. 40 nm wird über eine Sephadex Säule (Pharmacia PD 10) mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat umgepuffert. Zu der Suspension werden 0,5 ml 10 mmol Natriumperiodat-Lösung gegeben. Die Lösung wird 2 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Anschließend wird über eine PD 10 mit 0,1 M
10 Natriumhydrogencarbonat-Lösung eluiert. Zu der Suspension wird die Anti-Collagen III-Lösung gegeben. Die Mischung wird 3 Stunden bei 4°C im Dunkeln stehengelassen. Anschließend werden 5 mg NaBH₄ als Festsubstanz zugegeben und kurz geschwenkt. Die Mischung wird 8 Stunden bei 4 °C im Dunkeln stehengelassen. Anschließend werden die magnetitmarkierten Anti-Collagen III (im
15 folgenden Mag-Anti-Collagen III genannt) über eine PD 10 Säule mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (nachfolgend PBS, pH 7,4) eluiert. Eine Lösung von 5 µg Collagen III in 200 µl Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) wird in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. Anschließend wird die Flüssigphase verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit
20 phosphatgepufferte Kochsalzlösung, enthaltend 0,1 % Tween® 20 (nachfolgend PBST genannt), gespült. Zu der Probe werden 5 µl Mag-Anti-Collagen III in 200 µl PBST gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke 2 mT 4 cm unterhalb des Squid-Detektors magnetisiert (siehe Figur 1). 400 Millisekunden nach Abschalten des Magnetfeldes wird über 100 Sekunden die Relaxationsmessung durchgeführt. Bei der Probe wird über ein abklingendes Feld eine Relaxation nachgewiesen. Das Relaxationssignal der Collagen III enthaltenden Probe ist in Figur 2 dargestellt.

30

Beispiel 2

Eine Lösung von 5 µg Collagen V in 200 µl PBS Puffer pH 7,4 wird in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. Anschließend wird die Flüssigphase
35 verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit PBST Waschpuffer pH 7,4 gespült. Zu der Probe werden 5 µl Mag-Anti-Collagen III, hergestellt nach Beispiel 1, in 200 µl PBST gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke

-16-

- 2 mT 4 cm unterhalb des SQUID-Detektors magnetisiert (siehe Figur 1). Nach Abschalten des Magnetisierungsfeldes wird die Probe vermessen. 400 Millisekunden nach Abschalten des Magnetfeldes wird über 100 Sekunden die Relaxationsmessung durchgeführt. Bei der Collagen V enthaltenden Probe ist im Rahmen der 5 Meßsicherheit kein abklingendes magnetisches Feld detektierbar (siehe Figur 3).

Beispiel 3

- 10 Zu einer Lösung von 100 µg Collagen III in 1 ml PBS werden 100 µl Glutardialdehydlösung (3 % in Wasser) gegeben. Die Lösung wird 24 h bei 4°C gerührt und danach abzentrifugiert. Das Pellet enthält ausgefallenes vernetztes Collagen III. Das vernetzte Collagen III wird in 1 ml PBS suspendiert. (Probe 1). Zu einer Lösung von 100 µg Collagen V in 1 ml PBS werden 100 µl 15 Glutardialdehydlösung (3 % in Wasser) gegeben. Die Lösung wird 24 h bei 4°C gerührt und danach abzentrifugiert. Das Pellet enthält ausgefallenes vernetztes Collagen V. Das vernetzte Collagen V wird in 1 ml PBS suspendiert. (Probe 2). Zu den Proben 1 und 2 werden je 5 µl der Mag-Anti-Collagen III-Suspension aus Beispiel 1 gegeben. Es wird 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden beide 20 Proben in einer abgeschirmten Kammer in einem Magnetfeld der Stärke 2 mT unter einem SQUID-Detektor magnetisiert. 400 Millisekunden nach Abschalten des Magnetisierungsfeldes wird die Relaxationsmessung durchgeführt. Bei Probe 1 wird ein abklingendes Feld gemessen. Bei Probe 2 ist kein abklingendes Feld detektierbar.

25

Beispiel 4

- Aus 10 ml einer 1,9 mg/ml Collagen III-Lösung in PBS (pH 7,4) werden jeweils 5 30 ml der folgenden Verdünnungen hergestellt:

10000ng/ml, 1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml

- Von jeder Verdünnung werden je drei mal 1 ml in Polystyrolröhrenchen 35 (Fassungsvolumen 2,5 ml) pipettiert. Es wird 1 Stunde bei 37°C inhibiert. Danach wird der Inhalt der Röhrenchen verworfen. Die Röhrenchen werden 3mal mit je 1 ml PBST gewaschen.

-17-

In jedes Röhrchen werden 1 ml einer 1 : 100-Verdünnung des Magnétit markierten Antikörpers, hergestellt gemäß Beispiel 1, gegeben. Die Röhrchen werden 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach werden die Proben mit der in Figur 1 skizzierten Meßanordnung magnetisiert (2 mT) und nach Abschalten des
5 magnetisierenden Feldes wird über 100 Sekunden die Relaxation gemessen. Die Auswertung der Differenzen der gemessenen magnetischen Flußdichten B, 200 Millisekunden und 100 Sekunden nach Abschalten des magnetisierenden Feldes, in Abhängigkeit von der Collagenkonzentration in der Probe, ist in Figur 4 wiedergegebenen.

10

Beispiel 5

100 µg eines monoklonalen Antikörpers gegen Collagen III, im folgenden Anti-Collagen III genannt, werden in 500 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. 1 ml dextrangecoatete Magnetitsuspension mit 1 Mol Fe/l und einer Teilchengröße von ca. 40 nm wird über eine Sephadex Säule (Pharmacia PD 10) mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat umgepuffert. Zu der Suspension werden 0,5 ml 10 mmol Natriumperiodat-Lösung gegeben. Die Lösung wird 2 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Anschließend wird über eine PD 10 mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung eluiert. Zu der Suspension wird die Anti-Collagen III-Lösung gegeben. Die Mischung wird 3 Stunden bei 4°C im Dunkeln stehengelassen. Anschließend werden 5 mg NaBH₄ als Festsubstanz zugegeben und kurz geschwenkt. Die Mischung wird 8 Stunden bei 4 °C im Dunkeln stehengelassen. Anschließend werden die magnetitmarkierten Anti-Collagen III (im folgenden Mag-Anti-Collagen III genannt) über eine PD 10 Säule mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) eluiert.
Je 20 µl der Mag-Anti-Collagen III-Suspension werden mit 390 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,4, die zusätzlich 0,1 % PBST enthält verdünnt und in drei Probengefäße aus Polyacrylsäure gefüllt, die jeweils ein Fassungsvolumen von 500 µl aufweisen. Zum ersten Probengefäß werden 100 µl einer wäßrigen Lösung von humanem Serumalbumin (1 mg Albumin / ml) gegeben (Probe 1). Zum zweiten Probengefäß werden 100 µl einer Lösung von Collagen V in PBST (1 µg Collagen V / ml) gegeben (Probe 2). Zum dritten Probengefäß werden 100 µl einer Lösung von Collagen III in PBST (1 µg Collagen III / ml) gegeben (Probe 3). 200 Sekunden nach Zugabe der Proteinlösungen werden die Proben mit der in Figur 1 skizzierten Meßanordnung magnetisiert (2 mT) und 20 Millisekunden nach Abschalten des magnetisierenden Feldes beginnend über 1 Sekunden jeweils die magnetische Relaxation bestimmt. In den Proben 1 und 2 ist

im Rahmen der Meßsicherheit kein abklingendes magnetisches Feld detektierbar. In der Probe 3 ist dagegen ein abklingendes magnetisches Feld detektierbar. Die Messungen werden nach Entleeren der Probengefäße und dreimaligem Spülen mit je 500 µl PBST wiederholt. Es ist jetzt in keinem der Probengefäße im Rahmen der 5 Meßsicherheit ein abklingendes magnetisches Feld detektierbar.

Beispiel 6

- 10 100 µg Avidin werden in 500 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. 1 ml dextrangecoatete Magnetitsuspension mit 1 Mol Fe/l und einer Teilchengröße von ca. 40 nm wird über eine Sephadex Säule (Pharmacia PD 10) mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat umgepuffert. Zu der Suspension werden 0,5 ml 10 mmol Natriumperiodat-Lösung gegeben. Die Lösung wird 2 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Anschließend wird über eine PD 10 mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung eluiert. Zu der Suspension wird die Avidin-Lösung gegeben. Die Mischung wird 3 Stunden bei 4°C im Dunkeln stehengelassen. Anschließend werden 5 mg NaBH₄ als Festsubstanz zugegeben und kurz geschwenkt. Die Mischung wird 8 Stunden bei 4 °C im Dunkeln stehengelassen.
- 15 20 Anschließend werden das magnetitmarkierte Avidin (im folgenden Mag-Avidin genannt) über eine PD 10 Säule mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) eluiert.
- 25 1 mg Rinderserumalbumin wird mit Biotin-N-Hydroxysuccinimid (Sigma) konjugiert (im folgenden als Biotin-Albumin bezeichnet) und zu einer Konzentration von 1 µg / ml in PBS verdünnt.
- 30 35 1 ml der Biotin-Albumin-Verdünnung wird 3 h bei Raumtemperatur in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. Anschließend wird die Flüssigphase verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, enthaltend 0,1 % Tween® 20 (PBST), gespült. Zu der Probe werden 5 µl Mag-Avidin gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke 2 mT 4 cm unterhalb des Squid-Detektors magnetisiert (siehe Figur 1). 400 Millisekunden nach Abschalten des Magnetfeldes wird über 100 Sekunden die Relaxationsmessung durchgeführt. Bei der Probe wird ein abklingendes magnetisches Feld gemessen.
- 35 1 ml einer Verdünnung von Rinderserumalbumin in PBS (0,1 mg / ml) wird 3 h bei Raumtemperatur in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. Anschließend wird die Flüssigphase verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit phosphatgepufferte

-19-

Kochsalzlösung, enthaltend 0,1 % Tween® 20 (PBST), gespült. Zu der Probe werden 5 µl Mag-Avidin gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke 2 mT 4 cm unterhalb des Squid-Detektors magnetisiert (siehe Figur 5 1). 400 Millisekunden nach Abschalten des Magnetfeldes wird über 100 Sekunden die Relaxationsmessung durchgeführt. Bei der Probe wird im Rahmen der Meßsicherheit kein abklingendes magnetisches Feld gemessen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und/oder Festphasen dadurch gekennzeichnet, daß ferro- oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen als nachzuweisende magnetische Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden und die Relaxation ihrer Magnetisierung als Meßgröße bestimmt wird.
- 10 2. Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels magnetischer Relaxationsmessungen, dadurch gekennzeichnet, daß ferro- oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen als nachzuweisende magnetische Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen schneller verläuft als die Néelsche Relaxation.
- 15 3. Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels Messung der komplexen Suszeptibilität als Funktion der Frequenz dadurch gekennzeichnet, daß ferro- oder ferrimagnetische kolloidale Teilchen als nachzuweisende magnetische Markierung in Immunoassays oder sonstigen Bindungsassays eingesetzt werden, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen schneller verläuft als die Néelsche Relaxation.
- 20 4. Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, dadurch gekennzeichnet, daß die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst (i) mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden und anschließend (ii) diese markierten strukturspezifischen Substanzen in einer zu vermessenden flüssigen oder immobilisierten Probe eingesetzt werden, die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren ver messen wird.
- 25 30 35 5. Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, dadurch gekennzeichnet, daß Analyte zunächst

-21-

- (i) mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden und anschließend
- (ii) diese magnetisch markierten Analyte in einer zu vermessenden flüssigen oder immobilisierten Probe eingesetzt werden, der Substanzen zugesetzt wurden, die die Analyte spezifisch binden, und die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird.
- 10 6. Verfahren zur quantitativen Detektion von festphasengebundenen Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß die die Analyten bindenden strukturspezifischen Substanzen zunächst
- (i) mit im Zeitbereich der Messung relaxierenden ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden, wobei die ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen so gewählt werden, daß die Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und anschließend
- (ii) diese magnetisch markierten Substanzen in einer zu vermessenden immobilisierten Probe eingesetzt werden, und die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei das unterschiedliche Relaxationsverhalten der mit dem Analyten gebundenen gegenüber den ungebundenen magnetischen Markern zur Analyse herangezogen wird.
- 25 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß nachzuweisende Analyte mit im Zeitbereich der Messung relaxierenden ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und den zu vermessenden Proben zusätzlich die Analyte spezifisch bindende Substanzen zugesetzt werden, beziehungsweise die Analyte spezifisch bindende Substanzen in der Probe immobilisiert vorliegen.
- 30 8. Verfahren zur quantitativen Detektion von in flüssiger Phase vorliegenden Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß die die Analyten bindenden

- strukturspezifischen Substanzen zunächst
- (i) mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und anschließend
- (ii) diese magnetisch markierten Substanzen in einer zu vermessenden Probe eingesetzt werden, und die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei das unterschiedliche Relaxationsverhalten der mit dem Analyten gebundenen gegenüber den ungebundenen magnetischen Markern zur Analyse herangezogen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß nachzuweisende Analyte mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen eine kürzere Relaxationszeit aufweist als die Néelsche Relaxation und den zu vermessenden Proben zusätzlich die Analyte spezifisch bindende Substanzen zugesetzt wurden.
10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion die Messung der komplexen Suszeptibilität als Funktion der Frequenz herangezogen wird.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin spezifisch bindende Substanzen wie Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die an Rezeptoren bindenden Agonisten Zytokine, Lymphokine oder Endotheline sind.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ haben.
- 5 14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von 10^7 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ haben.
- 10 15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren Superconducting Quantum Interference Devices (SQUIDs), Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler eingesetzt werden.
- 15 16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Bestimmung von zwei oder mehreren verschiedenen Analyten in einer Probe durchgeführt wird.
- 20 17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, zwei oder mehrere ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit diskriminierbaren Brownschen oder Néelschen Relaxationszeiten verwendet werden.
- 25 18. Verbindungen zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels magnetischer Relaxationsmessungen oder mittels Messungen der komplexen Suszeptibilität als Funktion der Frequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kombinationen von ferro- oder ferrimagnetischen kolloidalen Teilchen mit strukturspezifischen Substanzen oder nachzuweisenden Substanzen bestehen.
- 30 19. Verbindungen zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels magnetischer Relaxationsmessungen oder mittels Messungen der komplexen Suszeptibilität als Funktion der Frequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kombinationen von ferro- oder ferrimagnetischen kolloidalen Teilchen mit strukturspezifischen Substanzen oder nachzuweisenden Substanzen bestehen, deren Brownsche Relaxation unter den Meßbedingungen schneller verläuft als die Néelsche Relaxation.

-24-

20. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Teilchengröße im Bereich von 1 bis 400 nm haben.
- 5 21. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Teilchengröße im Bereich von 1 bis 100 nm haben.
- 10 22. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden und/ oder Lipiden stabilisiert sind.
- 15 23. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Teilchengröße im Bereich von 1 bis 400 nm haben.
- 20 24. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Teilchengröße im Bereich von 1 bis 100 nm haben.
- 25 25. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 18, 19, 23 und 24, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden, Tensiden, Polymeren und/ oder Lipiden stabilisiert sind.
- 30 26. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 18, 19, 23 und 24, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin bindende Substanzen wie Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate, oder Lipoproteine sind.
- 35 27. Verwendung der Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 17 und 20 bis 22 in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergologie, Infektiologie, Hygiene,

Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik und medizinischen Diagnostik.

28. Verwendung der Verbindungen gemäß den Ansprüchen 18, 19, 23 und 24 in
5 der Fertilität, Histokompatibilität, Allergologie, Infektiologie, Hygiene,
Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umweltanalytik und medizinischen Diagnostik.
29. Verwendung von Kombinationen aus ferri- oder ferromagnetischen
10 Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen oder von Kombinationen aus ferri- oder ferromagnetischen Substanzen mit nachzuweisenden Analyten in Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 17 und 20 bis 22.
30. Verfahren zur magnetorelaometrischen Detektion in den menschlichen
15 Körper eingebrachter ferro- oder ferrimagnetischer kolloidaler Teilchen, dadurch gekennzeichnet, daß die Néelsche Relaxation der Magnetisierung dieser Teilchen nach Abschalten eines magnetisierenden Feldes bestimmt wird.
- 20 31. Verfahren zur Immunmagnetographie, dadurch gekennzeichnet, daß strukturspezifische Substanzen zunächst
(i) mit ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen markiert werden und anschließend
(ii) diese markierten strukturspezifischen Substanzen in den lebenden
25 Organismus eingebracht werden, das interessierende Volumen des Organismus mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Relaxation der Magnetisierung der magnetischen Marker mittels Magnetfeldsensoren vermessen wird.
- 30 32. Verfahren gemäß den Ansprüchen 30 und 31, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, Biotin oder Biotin spezifisch bindende Substanzen wie Avidin oder Streptavidin, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.

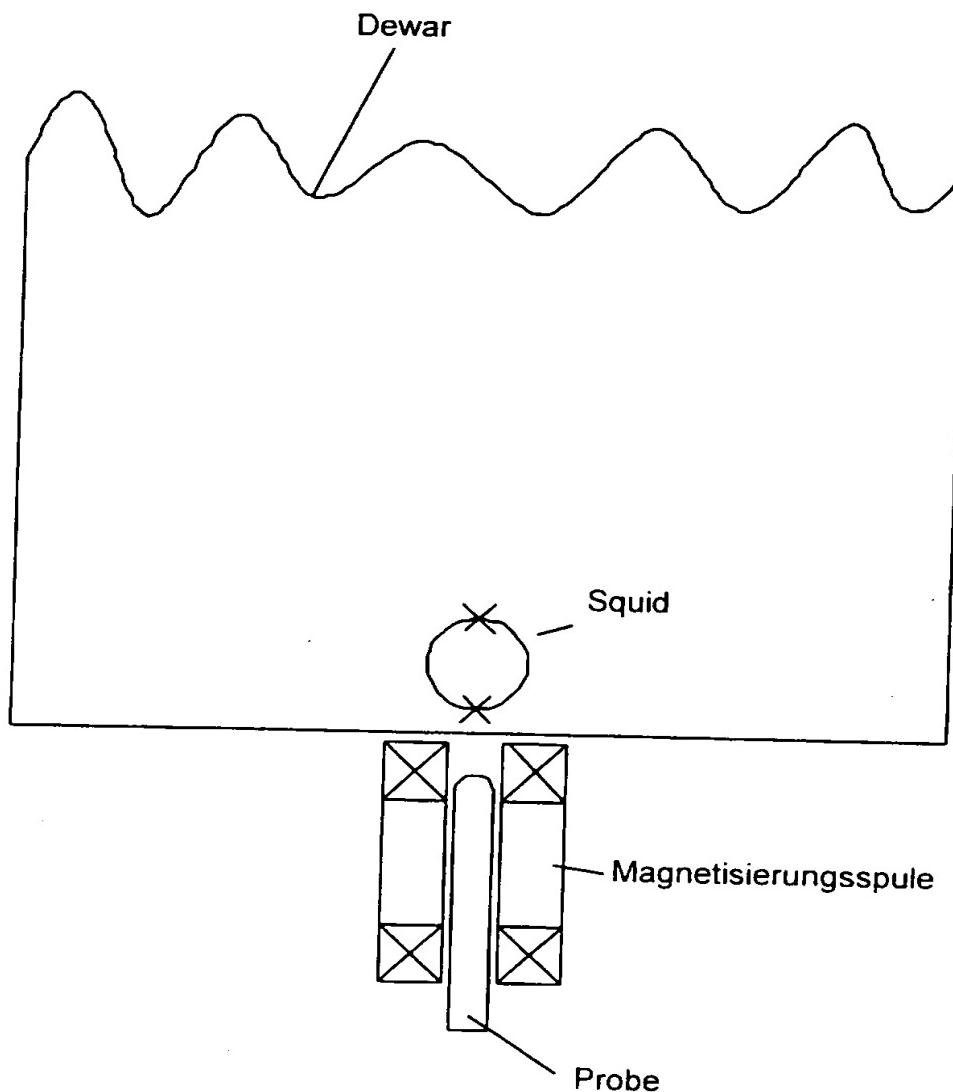
33. Verfahren gemäß Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die an Rezeptoren bindenden Agonisten Zytokine, Lymphokine oder Endotheline sind.
- 5 34. Verfahren gemäß den Ansprüchen 32 und 33, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von 10^5 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ haben.
- 10 35. Verfahren gemäß den Ansprüchen 32 und 33, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von 10^7 - 10^{15} (mol/l) $^{-1}$ haben.
- 15 36. Verfahren gemäß den Ansprüchen 30 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren Superconducting Quantum Interference Devices (SQUIDs), Induktionsspulen, Fluxgate-Magnetometer, Giant-Magnetoresistance-Sensoren oder magnetoresistive Wandler eingesetzt werden.
- 20 37. Verfahren gemäß den Ansprüchen 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle von Relaxationsmessungen die Messung der komplexen Suszeptibilität als Funktion der Frequenz zur Auswertung herangezogen wird.
- 25 38. Verwendung von Verbindungen gemäß den Ansprüchen 17 und 21 bis 24, in Verfahren gemäß den Ansprüchen 30 bis 37.
- 30 39. Verwendung von Kombinationen aus ferri- oder ferromagnetischen Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen in Verfahren gemäß den Ansprüchen 30 bis 37.
40. Verbindungen zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 30 - 37, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kombinationen biologisch abbaubarer ferri- oder ferromagnetischer Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen bestehen.
- 35 41. Verbindungen zur Anwendung in Verfahren gemäß den Ansprüchen 30 - 37, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kombinationen biologisch abbaubarer ferri- oder ferromagnetischer Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen

-27-

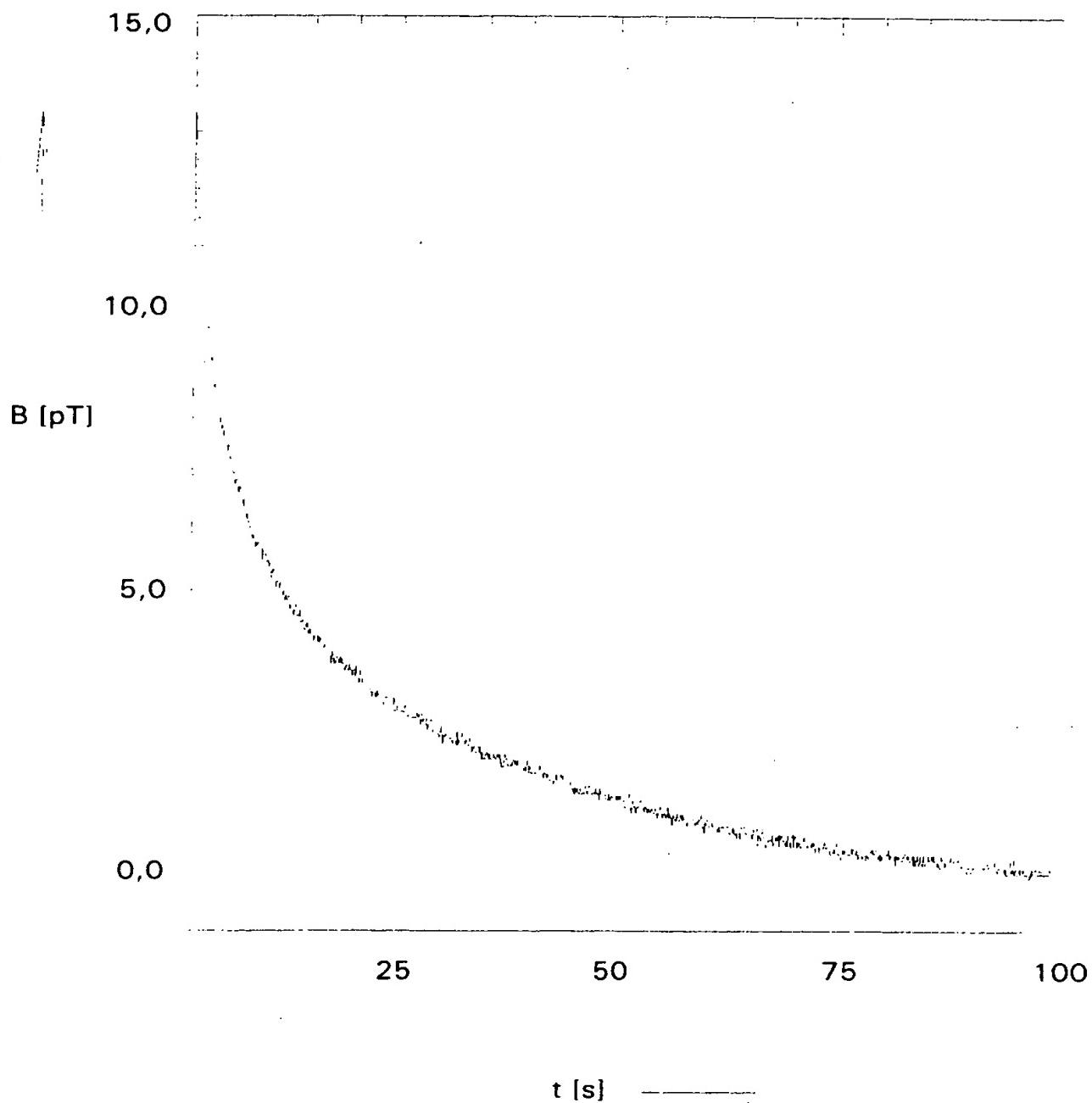
bestehen, wobei die Brownschen Relaxationszeiten der Kombinationen aus ferri- oder ferromagnetischen Substanzen mit strukturspezifischen Substanzen bei Körpertemperatur in Körperflüssigkeiten kürzer als die Néelschen Relaxationszeiten sind.

5

42. Verbindungen gemäß Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß die ferri- oder ferromagnetischen Substanzen Eisenoxide biologisch abbaubar sind.

Fig. 1

2/4

Fig. 2

3/4

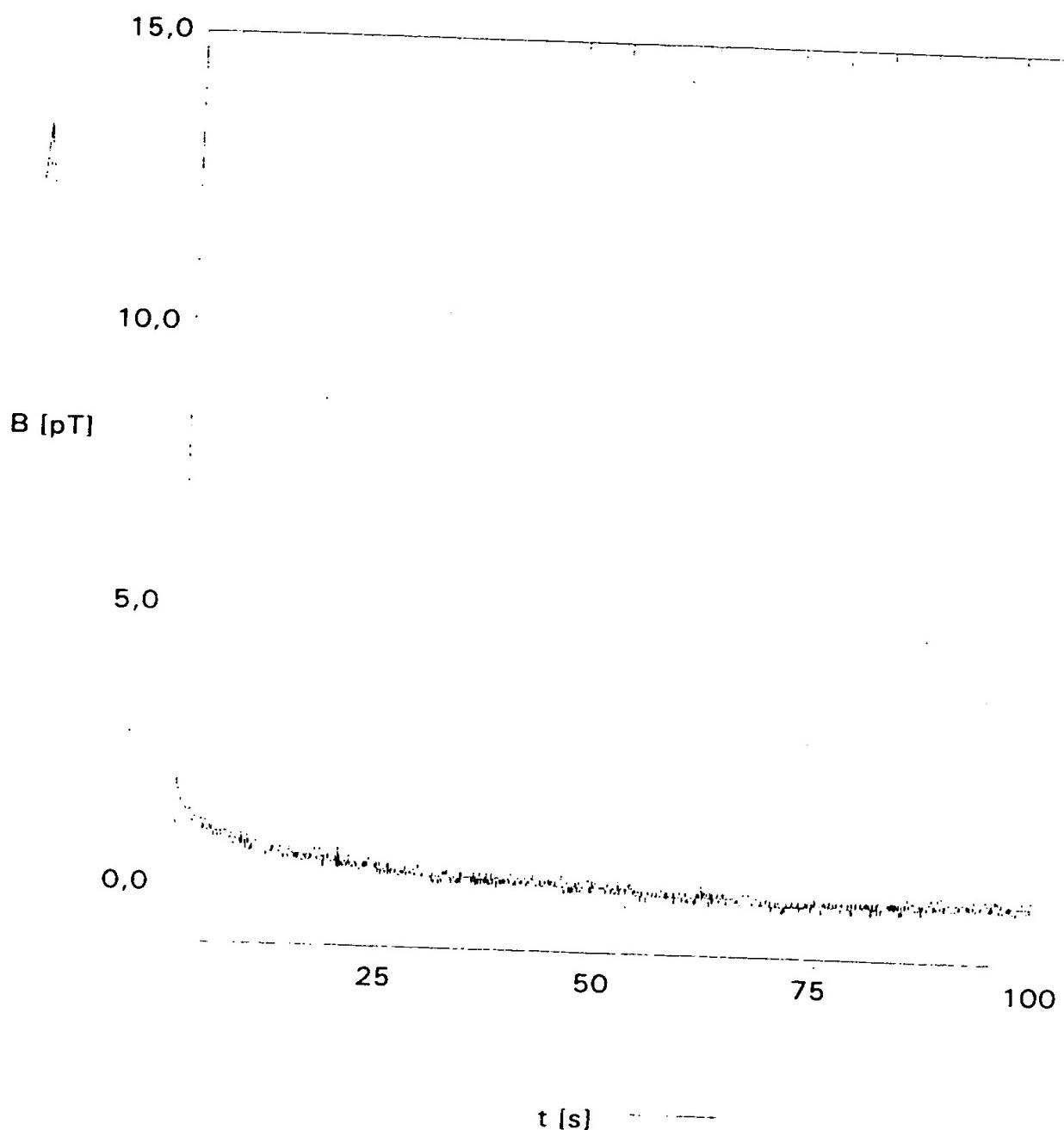
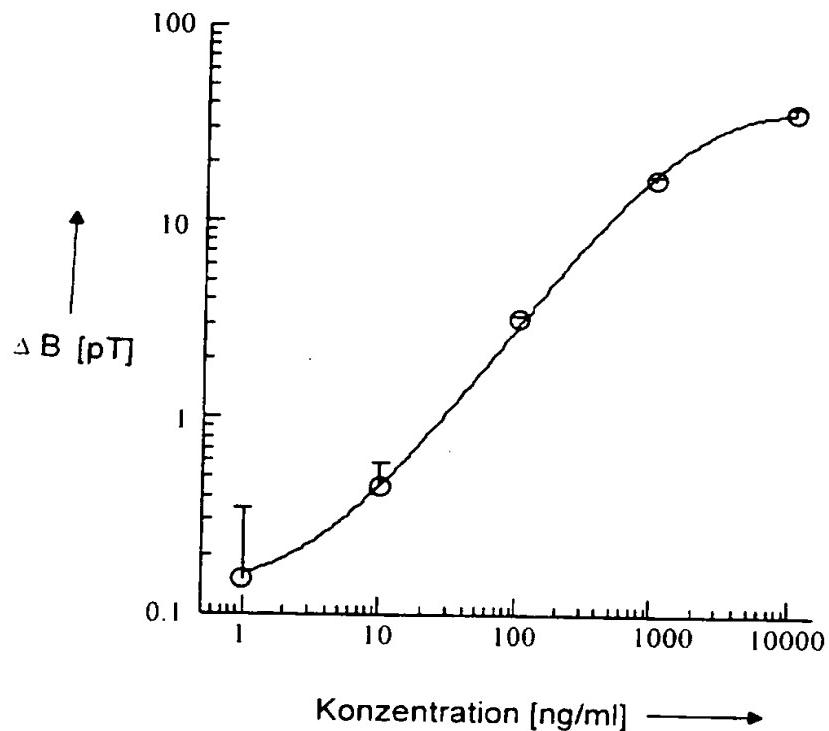
Fig. 3

Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/00339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/543 G01N33/532 G01R33/12 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N G01R A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	DE,A,43 09 333 (SILICA GEL GMBH ADSORPTIONS TE ; PILGRIMM HERBERT (DE)) 22 September 1994 see claim 6 ---	18,19, 23-26, 40-42
Y	WO,A,91 17428 (ADVANCED MAGNETICS INC) 14 November 1991 see the whole document ---	1-17, 20-22, 27-39
Y	JOURNAL OF PHYSICS D. APPLIED PHYSICS, vol. 27, no. 2, 14 February 1994, pages 189-193, XP000429783 FANNIN P C ET AL: "ON THE USE OF COMPLEX SUSCEPTIBILITY DATA TO COMPLEMENT MAGNETIC VISCOSITY MEASUREMENTS" see the whole document ---	1-17, 20-22, 27-39

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 1996

Date of mailing of the international search report

25.06.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

IN NATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/00339

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,91 15243 (COCKBAIN JULIAN R M ;NYCOMED AS (NO)) 17 October 1991 cited in the application see the whole document ---	1-17, 20-22, 27-39
A	JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, vol. 136, 1994, pages 49-58, XP000462355 P.C. FANNIN: "An experimental observation of the dynamic behaviour of ferrofluids" see the whole document ---	1-42
A	MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, vol. 31, no. 6, June 1994, pages 611-618, XP000570826 BRONSKILL, M.J. ET AL.: "Analysis of discrete T2 components of NMR relaxation for aqueous solutions in hollow fiber capillaries" see the whole document ---	1,2
A	J. APPLIED PHYSICS, vol. 49, no. 6, 1978, pages 3422-3429, XP002005268 BOGARDUS, H. ET AL.: "Dynamic magnetization in ferrofluids" see abstract -----	1-17, 20-22, 27-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/00339

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE-A-4309333	22-09-94	DE-A-	4407338	07-09-95
		DE-A-	4427821	01-02-96
		WO-A-	9421240	29-09-94
		EP-A-	0689430	03-01-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9117428	14-11-91	US-A-	5164297	17-11-92
		EP-A-	0527208	17-02-93
		US-A-	5254460	19-10-93
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9115243	17-10-91	AU-B-	655175	08-12-94
		AU-B-	7565591	30-10-91
		CA-A-	2079688	03-10-91
		EP-A-	0523116	20-01-93
		JP-T-	6507371	25-08-94
		US-A-	5384109	24-01-95
-----	-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 96/00339

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 G01N33/543 G01N33/532 G01R33/12 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprustoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
 IPK 6 G01N G01R A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprustoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE,A,43 09 333 (SILICA GEL GMBH ADSORPTIONS TE ; PILGRIMM HERBERT (DE)) 22.September 1994 siehe Anspruch 6 ---	18,19, 23-26, 40-42
Y	WO,A,91 17428 (ADVANCED MAGNETICS INC) 14.November 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-17, 20-22, 27-39
Y	JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS, Bd. 27, Nr. 2, 14.Februar 1994, Seiten 189-193, XP000429783 FANNIN P C ET AL: "ON THE USE OF COMPLEX SUSCEPTIBILITY DATA TO COMPLEMENT MAGNETIC VISCOSITY MEASUREMENTS" siehe das ganze Dokument ---	1-17, 20-22, 27-39

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- *' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts
17.Juni 1996	25.06.96
Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde Europäischer Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Hoekstra, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. 'es Aktenzeichen

PCT/EP 96/00339

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,91 15243 (COCKBAIN JULIAN R M ;NYCOMED AS (NO)) 17.Okttober 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-17, 20-22, 27-39
A	JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, Bd. 136, 1994, Seiten 49-58, XP000462355 P.C. FANNIN: "An experimental observation of the dynamic behaviour of ferrofluids" siehe das ganze Dokument ---	1-42
A	MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, Bd. 31, Nr. 6, Juni 1994, Seiten 611-618, XP000570826 BRONSKILL, M.J. ET AL.: "Analysis of discrete T2 components of NMR relaxation for aqueous solutions in hollow fiber capillaries" siehe das ganze Dokument ---	1,2
A	J. APPLIED PHYSICS, Bd. 49, Nr. 6, 1978, Seiten 3422-3429, XP002005268 BOGARDUS, H. ET AL.: "Dynamic magnetization in ferrofluids" siehe Zusammenfassung -----	1-17, 20-22, 27-39

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

je zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 96/00339

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-4309333	22-09-94	DE-A- 4407338 DE-A- 4427821 WO-A- 9421240 EP-A- 0689430	07-09-95 01-02-96 29-09-94 03-01-96

WO-A-9117428	14-11-91	US-A- 5164297 EP-A- 0527208 US-A- 5254460	17-11-92 17-02-93 19-10-93

WO-A-9115243	17-10-91	AU-B- 655175 AU-B- 7565591 CA-A- 2079688 EP-A- 0523116 JP-T- 6507371 US-A- 5384109	08-12-94 30-10-91 03-10-91 20-01-93 25-08-94 24-01-95

THIS PAGE BLANK (USPTO)